

А.С. Панфилов, Г.Я. Хулуп

МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МИКРОНОСИТЕЛИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИЗ ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОК

Витебский государственный
медицинский институт, ЦНИЛ

Иммуноактивные реагенты, присоединенные к магниточувствительным твердофазным носителям открывают новые пути развития современной иммунологии, гематологии, трансплантологии, биотехнологии и медицинской диагностики. Их используют для сепарации клеток, диагностики иммунодефицитных состояний, изоляции клеток крови и костного мозга по поверхностным маркерам, выделения ДНК, бактерий и антигенов. Нами разработана технология изготовления магниточувствительных микроносителей как из биodeградируемых материалов - альбумина сыворотки человека (ЧСА), так и из синтетических полимеров - полистирола. Исследовано влияние обработки раствором хлорида хрома (III) на повышение сорбционной емкости альбуминовых микросфер. Нами разработан процесс приготовления микросфер из стирола с магнетитом методом эмульсионной полимеризации в среде с повышенной плотностью. Нами исследована эффективность различных методов активации поверхности микросфер с целью повышения их сорбционной емкости.

В мировой практике иммунологических исследований широкое распространение получило использование иммуноактивных реагентов, присоединенных к магниточувствительным твердофазным носителям. Микроносители такого типа открывают новые пути развития современной иммунологии, гематологии, трансплантологии, биотехнологии и медицинской диагностики. Их используют при диагностике иммунодефицитных состояний и в ле-

чебной практике для изоляции клеток крови и костного мозга по поверхностным маркерам, выделения ДНК, бактерий и антигенов [3]. В последнее десятилетие широкое применение нашла иммуномагнитная сепарация клеток-мишеней, благодаря простоте, нетрудоемкости, скорости и эффективности протекания этого процесса. Проведение иммунных реакций с использованием иммуноактивных веществ - антител, антигенов, иммобилизованных на твердофазных магниточувствительных микроносителях, дает возможность осуществлять выделение требуемых субпопуляций клеток без использования сложного и дорогостоящего оборудования [5,11].

Крупнейшие фирмы мира Dynal (Норвегия), Myltenei (Германия), Baxter (США) занимаются разработкой новых технологий изготовления магниточувствительных микроносителей иммуноактивных реагентов [4]. Несмотря на значительное разнообразие технологии изготовления микроносителей иммуноактивных реагентов, в настоящее время она постоянно совершенствуется, так как существующие методы получения магниточувствительных микрочастиц достаточно сложны.

В качестве магниточувствительных микроносителей иммуноактивных веществ, применяют микросферы или микрокапсулы из различных природных и синтетических веществ полимерной природы [1,6].

Перед нами стояла задача разработать технологию изготовления магниточувствительных микроносителей как из биodeградируемых материалов - альбумина сыворотки человека (ЧСА), так и из синтетических полимеров - полистирола.

Работа выполнена в рамках Государственной научно-технической программы Республики Беларусь «Здоровье» - «Разработать композиционный материал и обоснованные на его использовании методы выделения субпопуляций иммунокомпетентных клеток, обосновать возможность их применения для иммунокоррекции», шифр 38.05, № гос. Регистрации 1994874. В основу технологии синтеза им-

муномагнитных микросфер из сывороточно-го альбумина человека нами положен метод термической коагуляции микрокапель эмульсии водного раствора компонентов микросфер, полученной посредством ультразвуковой обработкой, в нагретом до 120°C оливковом масле. [7]. Включение в их состав протеина A *Staphylococcus aureus*, обладающего способностью неспецифического связывания моноклональных антител, позволяет значительно упростить процесс конъюгации магнитных микросфер с антителами.

И изучен ряд работ зарубежных авторов [7,8,9], касающихся разработки и изготовления микросфер с включением в их состав протеина А, произведена модификация предложенных методов, имеющая целью получение микросфер с диаметром 5-7 мкм.

Целью исследования явилось получение микросфер из альбумина человека с высокой степенью активности при конъюгации с моноклональными антителами. Поставленная цель достигнута нами посредством подбора оптимального соотношения компонентов микросфер, использования ПАВ для перехода микросфер из масляной в водную фазу, применением насадки ультразвукового излучателя с большей площадью рабочей поверхности, изменением параметров мощности и длительности обработки ультразвуком, описанная в работе [7]. В качестве дополнительного фактора, способствующего конъюгации микросфер с антителами, нами предложена обработка взвеси микросфер раствором CrCl_3 ГОСТ 4473-78, в результате чего образуются хелатные связи молекул антител с поверхностью микросфер. Комплексный метод сшивки антител с поверхностью микросфер повышает их сорбционную емкость и предотвращает диффузию молекул антител с поверхности микросфер. На способ получения альбумин-протеиновых микросфер получено положительное решение Государственного па-

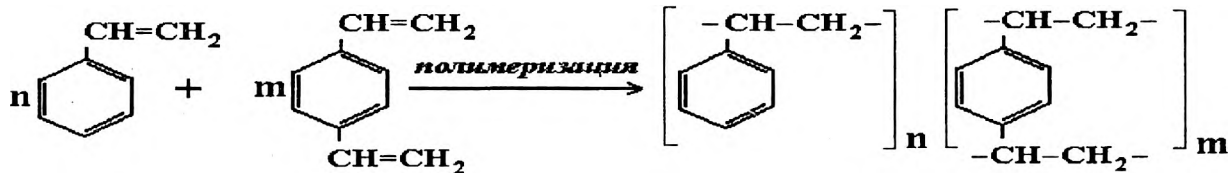
тентного комитета РБ за №1819 от 14.10.97.

Полимерные магниточувствительные частицы из синтетических материалов с ковалентно присоединенными к ним биоаффинными компонентами нашли широкое применение в качестве твердофазных иммунохимических реагентов и служат в качестве инструмента для фундаментальных исследований в медицинских исследованиях и биологии клетки [4]. Зарубежными иммунологами используются микросферы из полистирола Динабедс фирмы "Dynal" (Норвегия) [4]. Они представляют собой мономерные; пористые, полистироловые микрочастицы правильной сферической формы, содержащие равномерно распределенную дисперсию магнитного материала (Fe_2O_3) внутри каждой частицы. Эти магниточувствительные микрочастицы покрыты тонкой оболочкой полистирола, которая заключает в себе магниточувствительный материал и обеспечивает определенную площадь поверхности для абсорбции или связывания строго специфичных первичных и вторичных антител [10]. Однако технология их изготовления многоступенчата и требует использования сложного оборудования.

В связи с возможностью получения монодисперсных полистироловых микросфер, применение их в качестве твердой фазы при диагностике вторичных иммунодефицитов и использования в клиниках для сепарации клеток-мишеней оказалось достаточно обоснованным [11].

Нами разработан процесс приготовления микросфер из стирола с магнетитом методом эмульсионной полимеризации с использованием в качестве стабилизаторов эмульсии ПАВ. В качестве инициатора полимеризации мы использовали органическое перекисное соединение азо-бис-изобутиронитрил - динитрил азоизомасляной кислоты («Sigma» США).

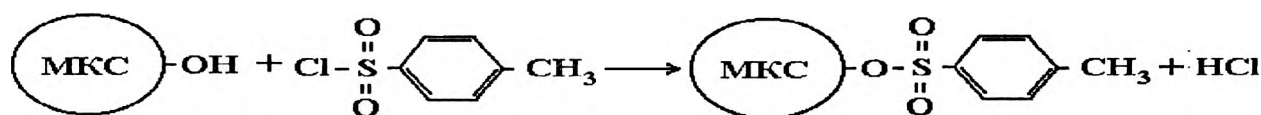
В качестве поперечно-сшивающего агента нами использован п-дивинилбензол



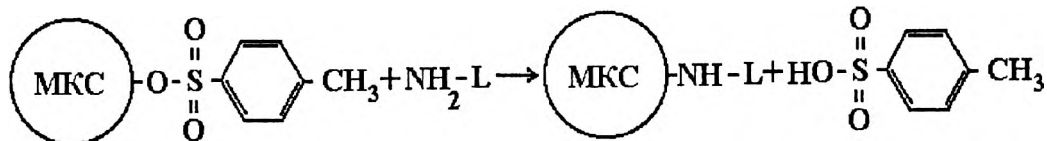
(«Sigma» США). В основу метода положена реакция полимеризации стирола с дивинилбензолом («Sigma» США).

Разработанный нами процесс изготовления микросфер из стирола заключается в диспергировании в водно-глицериновой среде с повышенной плотностью эмульсии смеси мономеров и поперечно-сшивающих компонентов и магнитного компонента, в качестве которого нами использован магнетит Fe_2O_3 приготовленный по методу Ахалая (1984), с растворенным в ней катализатором процесса полимеризации. Полимеризацию осуществляли без перемешивания при температуре 90°C . За счет высокой плотности среды происходит формирование капель эмульсии правильной сферической формы без их седиментации в течение процесса полимеризации. Добавление поверхностно-активных веществ препятствует коалесценции капель эмульсии. В результате осуществления указанного выше процесса нами получены магниточувствительные частицы из полистирола правильной сферической формы диаметром 2,6- 5 мкм [6].

Для активации поверхности микросфер с целью присоединения иммуноактивных компонентов обработку микросфер проводили 6% раствором п-толуолсульфонилхлорида.



При присоединении молекулы белка происходит реакция замещения остатка п-толуолсульфонилхлорида на молекулу белка, в результате которого белок оказывается ковалентно связанным с поверхностью микросферы.



Нами исследована эффективность различных методов активации поверхности микросфер с целью повышения их

сорбционной емкости по отношению к антигенам. Проведены исследования сорбционной емкости суспензии микросфер стандартной концентрации, предварительно активированных: 1) 25% раствором глутарового альдегида («Sigma» США); 2) гамма-излучением; 3) 6% раствором п-толуолсульфонилхлорида («Reanal, Венгрия»); 4) контроль (0,9% NaCl). В качестве конъюгата нами использованы диагностические антитела против иммуноглобулина человека, меченные пероксидазой хрена («МедБиоСпектр», Россия). Процесс взаимодействия равных объемов вышеуказанных групп с антителами проводили в плоскодонной 96-луночной планшете для иммуноферментного анализа. Количество присоединенного иммуноглобулина оценивали постановкой иммуноферментной реакции на пероксидазу хрена. Та же реакция проводилась с раститрованными антителами в лунках той же планшеты для построения калибровочной кривой. Оценку связывающей способности магнито-микросфер производили на иммуноферментном анализаторе АИФ-Ц01С (НПО «Витязь», Белоруссия). Как видно из рис. 1, активация п-толуолсульфонилхлоридом способствует наибольшей сорбционной емкости микросфер. Несколько менее эффективной является активация 25% глутаровым альдегидом. Активация воздейст-

ствием гамма-излучением повысила сорбционную емкость микросфер по сравнению с контролем. В результате проведенных исследований было установлено, что магнито-микросферы, активированные п-толуолсульфонилхлоридом, имеют самую вы-

сокую сорбционную емкость по отношению к антигенам - до 91 %. В случае применения глутарового альдегида сорбци-

онная емкость несколько ниже - 71,7 %, у активированных гамма-излучением микросфер - 69,8% в то время как для неактивированных микросфер она составила 62,9 %.

нальными антителами, для использования в процессе иммуномагнитной сепарации // Теоретические и прикладные вопросы современной медицины и фармации: Сборник научных трудов.- Витебск, 1996.-

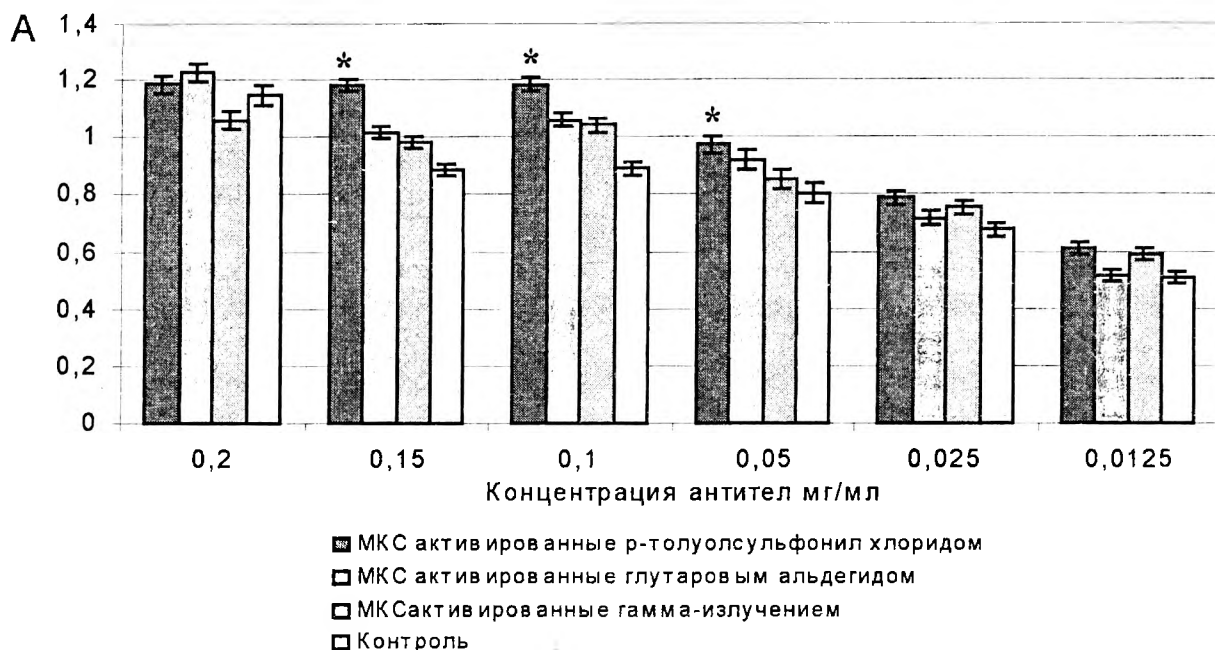


Рис. 1. Сравнительная характеристика эффективности методов активации магнито-микросфер из полистирола

По результатам проведенных нами исследований МЗ РБ утверждены методические "Получение магниточувствительных микросфер, конъюгированных с моноклональными антителами" (1996).

Разработанные иммуномагнитные микросферы из сывороточного альбумина человека и полистирола успешно использованы нами для предварительной сепарации взвеси клеток костного мозга от Т-лимфоцитов, ответственных за инициацию реакции трансплантат-против-хозяина, с целью его последующей трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Афанасьев А.Г. Микрокапсулирование и некоторые области его применения.-М.: Знание,- 1982.
2. Панфилов А.С., Хулуп Г.Я., Бекиш О-Я.Л., Виленский Г.М. Технология магниточувствительных микрокапсул из стирола, конъюгированных с монокло-

С.149-151.

3. Тамацу К. Приготовление лекарственных форм и введение их в организм.//Биополимеры.- М.: Мир.- 1988.- С 508-518.
4. Ugelstad J, Berge A, Ellingsen T, Schmid R, Nilsen TN, Mork PC, Stenstad P, Hornes E, and Olsvik O. Preparation and application of new monosized polymer particles// Prog. Polym. Sci.- 1992.- №17.- P.87-161.
5. Drobyski W.R., Ash R.C., Casper J.T. et. al. Effect of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis on engraftment, relapse, and disease-free survival in unrelated marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia // Blood.- 1994.- Vol. 83.- N 7.- P. 1980-1987.
6. Winoto-Morbach S., Muller-Ruchholtz W. Preparation and functionality testing of biodegradable and biocompatible magnetic albumin nanospheres for cell labeling and immunomagnetic separation//Eur. J.

Pharm. and Biopharm.- 1995. Vol.41.-N1.- P. 55-61.

7. Kandzia J.M., Anderson J.D., and Muller-Ruchholtz.//J.Cancer Res.Clin.Oncol.- 1981. N101.-P.165-167.

8. Widder K., Flouret G., Senyei A. Magnetic microspheres: synthesis of a novel parenteral drug carrier.// J. Pharm. Sci.- 1979.- N68.- P.79-82.

9. Gupta P.K., Hung C.T. Albumin microspheres. Part 5. Evaluation of parameters controlling the efficacy of magnetic microspheres in the targeted delivery of adriamycin in rats.// Int. J. Pharm.- 1990.- N59.- P.57-67.

10.Piskin E., Tuncel A., Denizli A., Ayhan H. Monosize microbeads based on polystyrene and their modified forms for some selected medical and biological applications// J. Biomater. Sci. Polym. Ed.- 1994.- Vol.5.- N5.- P. 451-71.

11.Roder B.; Zuhlke A.; Widdecke H.; Klein J. Synthesis and application of new microcarriers for animal cell culture. Part II: Application of polystyrene microcarriers.// J.Biomater.Sci.Polym.Ed.- 1993.- Vol.5.- N1-2.- P.79-88.

12.Gee A.P., Mansour V.H., Weiler M.B. Effect of target antigen density on the efficacy of immunomagnetic cell separation //J. Immunol. Meth. - 1991. - Vol.142. - P.127 - 136.

SUMMARY

Immunoactive reagents attached to magneto-sensitive solid phase carriers open new ways of development modern iimmunology, haematology, transplantology, biotechnology and medical diagnostics. Them use for separation of cells, diagnostics of immunodficiency conditions, isolation of blood and bone marrow cells on superficial markers, allocation DNA, bacteria and antigenes. We develop production process of magnetosensitive of microcarriers as from biodegrade-ble materials - human albumin (HSA), and from synthetic polymers - polystyrene. The influence of processing by a solution of chlore chloride (III) and increase of sorbtion capacity of albumin microspheres is investigated. We develop process of preparation of microspheres from styrene with magnetite by a method of emulsion polymerization in medium with increased density. We investigate the efficiency of various methods of activation of a surface of microspheres with the purpose of increase them sorbtion capacity.

